

Genómica de cítricos ('Citrus genomics')

Centro de Genómica, Instituto
Valenciano de Investigaciones
Agrarias (IVIA),
Apartado Oficial,
46113 Moncada (Valencia).

Email: talon_man@gva.es

Esta sesión del congreso nos ofreció el plato fuerte del mismo y una información crucial por la que en los años venideros se recordará este evento, ni más ni menos que la secuenciación del genoma de los cítricos. Sin duda la investigación en cítricos cambiará a partir de este momento, a raíz de la información que ofrece la secuencia del genoma de los agrios y de las facilidades con las que contarán los científicos del campo cítrico.

Las presentaciones orales relacionadas con el genoma de los cítricos, que fueron 7, exploraron nuevas áreas de estudio y herramientas tecnológicas y biológicas que mejorarán sin duda todos los campos de la citricultura desde el cultivo propio de los cítricos hasta la disciplinas de la Biología y de la Fisiología o de las aplicaciones relacionadas con la mejora de las especies cultivadas, la generación de nuevas variedades o las técnicas biotecnológicas de protección vegetal. Tras las presentaciones directamente relacionadas con la dilucidación de las secuencias de DNA de los genomas de los cítricos, se abordaron por este orden, temáticas centradas en la generación del mapa genético de los cítricos, preciso para orientar y guiar el anclaje de las secuencias en los cromosomas y en la propia citogenética de los cromosomas de los cítricos. En la presentación siguiente se mostró un análisis de identificación de genes relacionados con la partenocarpia mediante un estudio del transcriptoma de los tejidos de las flores, y por último en la presentación oral final se expuso la utilidad de un vector viral para realizar estudios de funcionalidad génica.

Las presentaciones en formato de poster (15 en total) se dividieron por temáticas afines y relacionadas dentro del concepto general de genómica. Así, se presentaron dos estudios relacionados con la expresión génica en tallos de limón y en cítricos afectados por el mal seco y por la cancrrosis. La caracterización funcional de genes relacionados con estreses abióticos y con el desarrollo de características de maduración fue objeto de las tres presentaciones posteriores. La poliploidia, la floración y la juvenilidad fueron motivo de otras tres charlas. La sesión continuó con dos estudios paralelos sobre la identificación de proteínas relacionadas con el metabolismo primario y con el estado redox. El estudio del origen de los cítricos mediante el análisis de ESTs y la secuenciación de genomas ocuparon las dos charlas siguientes. Estas presentaciones fueron seguidas por tres exposiciones sobre la obtención de marcadores, la utilidad de la Biología de Sistemas y minería de datos para la identificación de genes de interés y, por último sobre las posibilidades de genotipar variedades de cítricos mediante fusión de alta resolución.

Comunicaciones orales

La exposición inicial, que fue la exposición estrella, se realizó a cargo del **Consorcio Internacional de Genómica de Cítricos**, formado por centros de investigación de USA, Francia, Italia, Brasil y España, representada por el IVIA. En ella se presentó el **genoma** de los cítricos dilucidado en una variante de la **Clementina de Nules** que ha servido como genoma de referencia para el resto de secuenciaciones de genomas que se presentaron en las charlas subsiguientes. También se ofreció la secuencia del genoma de la naranja dulce y se realizó un análisis comparativo de genomas de cítricos que ha permitido descubrir el origen de las variedades cultivadas de cítricos (Figura 1). Así, la domesticación de

los cítricos se produjo mediante cruces de dos variedades ancestrales, *Citrus reticulata*, que sería el contribuidor mayor de las mandarinas actuales y *Citrus maxima*, que era muy semejante al pumelo actual. Con esta información se concluyó que el naranjo amargo es un híbrido directo de estos pumelos y mandarinas ancestrales, mientras que la naranja dulce es un producto de un mestizaje mas complejo en el que los dos parentales poseían mezclas genómicas de mandarinas y pumelos ancestrales. El estudio también permitió dilucidar el origen de nuestra clementina, que resultó ser un cruce directo del mandarino común y de la naranja dulce.

La segunda exposición corrió a cargo de representantes del **Centro de Genómica del IVIA**, que en nombre del Consorcio español CITRUSEQ, informó de la secuenciación del **genoma de 150 variedades de cítricos** representativas e importantes para la citricultura española, estudió que permitirá un desarrollo considerable de nuevas herramientas de trabajo y de tecnologías con un amplio abanico de posibilidades. El Consorcio CITRUSEQ, en un esfuerzo conjunto desarrollado por instituciones públicas y empresas privadas ha generado un portal web que permite la búsqueda y comparación entre las secuencias de aproximadamente 8 millones de variantes de genes encontrados y entre 45 mil millones de pares de bases. Los análisis iniciales sugieren que la información almacenada puede ayudar a desentrañar los aspectos fundamentales de interés biológico y evolutivo, como el origen de los cítricos, el mecanismo de generación de variedades espontáneas, la identificación de puntos calientes de recombinación, y los efectos de las mutaciones inducidas. Desde el punto de vista comercial esta **información es crucial para la autenticación y para la mejora y obtención** de variedades y para identificar genes de interés agronómico relevante.

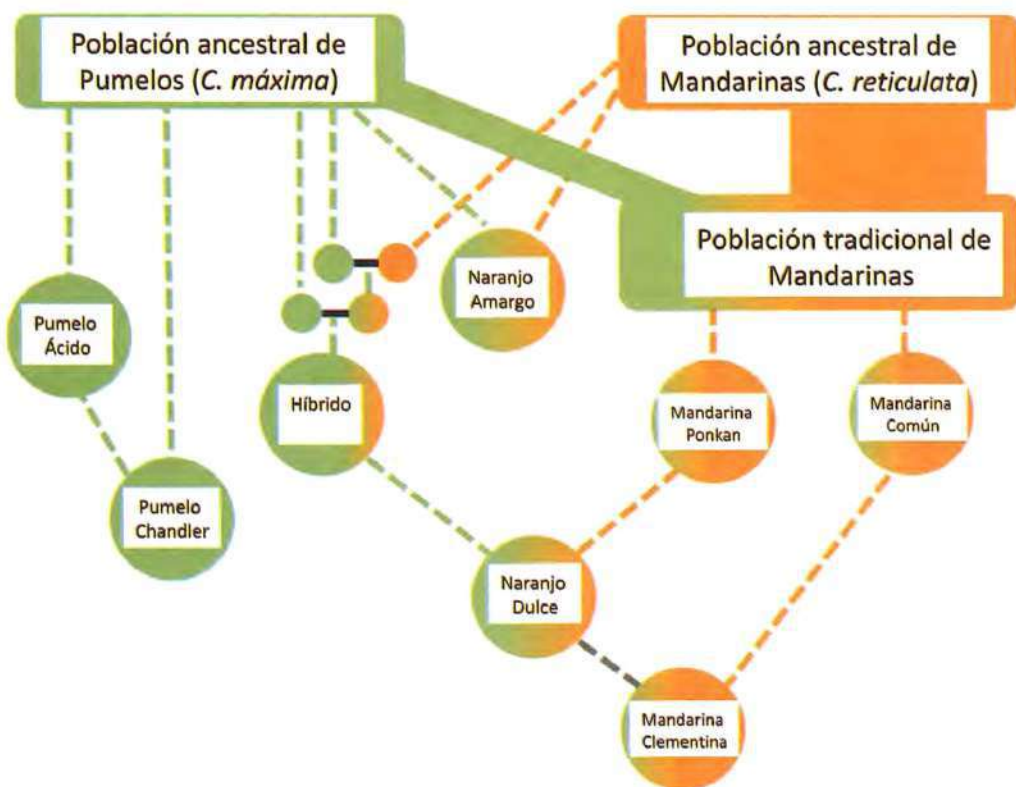
Continuando con esta línea, la siguiente exposición abordó la secuenciación en **Japón** del **genoma de 11 variedades** de cítricos, mayoritariamente **satsumas**, con la idea de obtener variantes génicas para su posterior uso en mejora de variedades. Shimizu y cols. reportan que tanto el número de variantes, así como la proporción de ellas tanto homocigóticas como heterocigóticas fueron bastante diferentes entre las variedades.

El equipo proveniente de Wuhan (China) se centró en la **secuenciación del genoma de la naranja dulce**, una aportación prácticamente idéntica a la presentada por el consorcio internacional que ofreció el genoma de la clementina. El resto de la exposición de Xu y cols., sorprendió a todos los presentes, pues aunque no constaba en su comunicación escrita ni en el título de la ponencia, continuaron con el estudio sobre el origen de la naranja dulce, que a todas luces era un trabajo idéntico en concepción y desarrollo y por tanto paralelo al presentado anteriormente por el consorcio internacional. Sin embargo, pronto quedó claro que las conclusiones del estudio eran distintas, ya que la propuesta china contemplaba un origen en el que uno de los parentales era híbrido de pumelo por mandarina mientras que el otro era una mandarina.

Tras estas 4 presentaciones de alto voltaje, se presentaron los resultados de una amplia colaboración que implicaba a los numerosos grupos de investigación pertenecientes a varios países que generaron el mapa genético de *Citrus clementina*, que entre otros desarrollos sirvió al consorcio internacional para establecer un marco genético sobre el que asentar en los cromosomas las lecturas de las secuencias con objeto de desentrañar la secuencia del genoma haploide de clementina. **El mapa genético también corroboró el origen de la clementina y los puntos de recombinación de la variedad haploide utilizada en la secuenciación del genoma de la clementina.**

La siguiente charla, expuesta por investigadores brasileños (Silva y cols.), abundó en la **citogenética de los cromosomas** de cítricos y propuso la búsqueda de una nomenclatura unificadora basada en la evolución de los distintos

Figura 1. Origen filogenético de las principales especies cultivadas de cítricos.



cariotipos. En este trabajo se utilizaron diversos tipos de marcadores para identificar cada uno de los pares de cromosomas y poder construir mapas citogenéticos de varias especies de cítricos. Mientras que al aparecer, los cromosomas 1, 4 y 8 se han conservado de una forma relativa, el cromosoma 3 es especialmente variable, lo que sugiere reajustes estructurales adicionales tales como inversiones.

Las dos últimas exposiciones estuvieron dedicadas a los análisis de identificación y de funcionalidad génica. La primera de ellas, presentada por un grupo italiano se centró en el estudio de la base genética de la autoincompatibilidad de los cítricos. El análisis comparativo del transcriptoma floral de dos genotipos de clementina condujo a la identificación de un conjunto de genes candidatos relacionados con la autoincompatibilidad. Los genes identificados, al parecer, son totalmente desconocidos porque no muestran homología con genes de otras especies de plantas. Algunos de estos genes muestran un incremento de su expresión en concomitancia con la detención de la elongación del tubo polínico.

La exposición oral final corrió a cargo de un grupo español (Agüero y cols.) que explicó la utilidad de un **nuevo vector viral** basado en el genoma de un virus que ataca a los cítricos para **estudiar la función** desconocida de un **determinado gen**. El método parece ser altamente efectivo pues los ensayos generados con genes que controlan la síntesis de carotenoides o de la fotosíntesis o incluso genes promotores de la floración mostraron que la infección con el virus provoca un cambio en la expresión de los transgenes que se manifestaba durante al menos dos años en las plantas infectadas.

Comunicaciones en panel

Las comunicaciones en forma de poster se iniciaron con un estudio clásico sobre la expresión génica diferencial entre plantas de limón afectadas de dos problemas principales, la destructiva enfermedad conocida como **"Mal Secco"** causada por el hongo *Phoma tracheiphila* y el **daño por frío** causados por bajas temperaturas. El análisis de las secuencias diferenciales reveló homología con genes previamente identificados que participan en los **mecanismos de defensa contra estrés biótico y abiótico**. En la siguiente

comunicación, que versó sobre la **can-crosis de los cítricos** (*Xanthomonas axonopodis* pv. Citri), se reportó que de un total de 14 accesiones testadas se encontró que una variedad de cidro chino (*Citrus medica*) mostró resistencia completa y activa a esta enfermedad. El estudio comparativo de los perfiles de transcripción de muestras sensibles y resistentes reveló que el número de las secuencias reguladas en las muestras resistentes era mayor. Además, en el estudio se han identificado más de 20 genes que estaban involucrados en la vía de la interacción planta-patógeno.

La siguiente comunicación se centró en la caracterización funcional de genes asociados con dos rasgos de importancia agronómica en los cítricos, como la **resistencia a la sequía y el color de la fruta**. Este grupo ha estado usando las herramientas de la genómica, biología molecular, y la tecnología del ADN recombinante para alcanzar este fin. Algunos de sus resultados incluyen la identificación de miembros de las familias de factores de transcripción implicados en la respuesta de estrés hídrico, la caracterización de acuaporinas involucradas en la deshidratación, la descripción de un mecanismo alternativo de regulación de la biosíntesis de hormonas en relación con la tolerancia al estrés abiótico, la caracterización de dos nuevos genes que controlan la síntesis de betacarotenos y la identificación de varias formas de los genes involucrado en la biosíntesis de licopeno. La exposición siguiente versó sobre la posibilidad de determinados genes de interactuar en la **tolerancia o resistencia al frío**. El trabajo muestra que estos genes aumentan significativamente su expresión cuando la disminución de la temperatura llega al menos a 5 °C. El máximo nivel de expresión se observó en las plantas tolerantes al frío de naranja trifoliada, seguido de kumquat (*Fortunella crassifolia*), pomelo (*Citrus grandis*), naranja dulce (*Citrus sinensis*) y por último el limón (*Citrus limon*). El estudio prosigue con una descripción estructural de estos genes en donde se señalan las diferencias y similitudes que pueden ayudar a explicar sus efectos sobre la resistencia a las bajas temperaturas. Esta presentación se complementó con una exposición sobre otro tipo de genes, de relativa importancia en los cítricos que contribuyen quizá al

desarrollo de la planta. Estas proteínas que son ricas en prolina representan una clase de proteínas de la pared celular. Los estudios de expresión mostraron que la transcripción de estos genes se realizaba preferentemente en hojas. Una secuencia de su promotor fue clonada y su actividad se ensayó mediante el uso de un gen indicador GUS bajo su control. El promotor dirigió la expresión en hojas y cotiledones de plantas de *Arabidopsis thaliana*. Las plantas RNAi mostraron un fenotipo relacionado con el retraso en el crecimiento. Mediante microscopía electrónica se reveló que el bloqueo de la expresión también reducía el número y tamaño de los granos de almidón en los cloroplastos, lo que indica que estos genes pueden estar implicados en el desarrollo y el metabolismo de hidratos de carbono de las hojas.

La comunicación siguiente (Niños y cols.) cambió el registro de estudio al centrarse en los efectos de la poliploidía, que ha sido reconocida como una fuerza importante en la evolución de las plantas con flores, porque a menudo resulta en nuevos fenotipos que no están presentes en sus progenitores diploides. El grupo reporta que en trabajos anteriores se generaron clementinas sintéticas con diferentes niveles de ploidía, específicamente líneas haploides, dihaploides y autotetraploides. Curiosamente, las líneas dihaploides no fueron capaces de formar flores, mientras que las líneas haploides, diploides y líneas autotetraploides sí. Mediante el uso de un enfoque de microarrays, se realizó un análisis exhaustivo de divergencia y en particular se han explorado nuevos patrones de expresión de genes relacionados con la capacidad de florecer. Se encontraron diferencias en la expresión en el tejido de la corteza de los cuatro linajes y a raíz de los distintos análisis se seleccionaron 16 genes supuestamente implicados en las diferencias encontradas en las flores. También relacionada con la floración, la siguiente presentación (Muñoz-Fambueña y cols.), describió un trabajo cuyo objetivo fue determinar la relación entre la **expresión de los genes de la floración y el tipo de brotación**. Para este fin, se utilizaron brotes de la mandarina 'Moncada' y tras el análisis se concluyó que los resultados indican que las inflorescencias con hojas y sin hojas muestran expresión diferencial de determina-

dos genes de la floración. Así, existe una ausencia de relación entre el número de flores por inflorescencia y la expresión relativa de los genes de la floración. Por otra parte, los diferentes niveles de expresión de otros tipos de genes, como los genes homeóticos florales parecen estar relacionados con la aparición de diferentes tipos de brotaciones o inflorescencias. El siguiente panel (Castillo y cols.) versó sobre el **acortamiento de la fase juvenil** en plantas de *Arabidopsis* obtenidas mediante la expresión ectópica de factores de transcripción cítricos. En los cítricos, la juvenilidad es un período largo (5-20 años, dependiendo de la variedad) durante el cual la iniciación floral no ocurre incluso bajo condiciones ambientales que normalmente son inductivas. En este trabajo se han identificado varios factores de transcripción diferencialmente expresados en las fases juveniles y adultas. Algunos de ellos son genes que participan en los procesos de desarrollo, mientras que otros mostraron una alta similitud de secuencia parcial restringida a dominios específicos. Se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan estos TFS y se determinaron diversas características morfológicas como el número de hojas, tricomas, el tiempo de floración y la morfología de las hojas y las silículas. Algunas plantas mostraron un acortamiento de la fase juvenil, lo que indica que estos genes están probablemente involucrados en la determinación de la transición de la fase reproductiva.

Tras estas exposiciones se presentaron dos trabajos paralelos (Muñoz-Fambueña y cols.) centrados en la expresión diferencial de proteínas relacionadas con el metabolismo primario y con el estado redox en hojas de la mandarina 'Moncada' con carga de frutos diferente. En relación con el estudio sobre el metabolismo primario, las muestras fueron recolectadas en noviembre, las proteínas extraídas y se seleccionaron 33 "spots" de los cuales, la mayoría se asociaron al metabolismo de hidratos de carbono y la fotosíntesis, y un número menor al ciclo de Krebs. La identificación de las proteínas se llevó a cabo por MALDI-MS o LC-MS-MS. Según estos resultados, el metabolismo primario parece ser más activo en las hojas de árboles con poca carga, lo que sugiere que la carga de frutos inhibe el metabolismo primario en la

variedad 'Moncada'. El otro estudio pre-teómico se centró en el estado redox de cítricos y en la respuesta al estrés relacionado con la carga de fruta. Así, de acuerdo con los resultados obtenidos, en general, en las muestras de árboles en los años de escasa carga, las proteínas con actividad oxidoreductasa son las mayormente reguladas, mientras que en las muestras de los árboles con carga lo son las proteínas relacionadas con la respuesta al estrés y a la actividad oxidoreductasa. Por lo tanto, los autores concluyeron que el estado redox es diferente para los dos tipos de árboles.

En la siguiente exposición (Zhong y cols.) se analizaron las secuencias de EST de cítricos para abordar los orígenes de *Citrus sinensis*, *Citrus clementina* y *C. poonensis*. Esta aproximación es paralela a la empleada por el Consorcio Internacional de cítricos, que presentó sus resultados en la parte de las presentaciones orales, excepto que en este caso se aborda el estudio en base a las secuencias de ESTs mientras que el Consorcio trabajó con las secuencias genómicas. Dos enfoques distintos, la comparación entre haplotipos y el análisis filogenético se utilizaron para estudiar 359 loci diferenciales de genes de cítricos. Se demostró que las tres especies, *C. sinensis*, *C. clementina* y *C. poonensis* son a lo largo de todo su genoma heterocigotos. De la inferencia del análisis de datos se

deriva que *C. clementina* proviene de un cruce entre una mandarina y *C. sinensis*, y la mandarina se confirmó que era *C. deliciosa*, mediante el genotipado de 25 SNPs representativos. A su vez, *C. sinensis* debió originarse por al menos tres cruces, [(pomelo mandarina x) x pomelo o toronja x (x pomelo mandarina)] x mandarina. Se discutió la evolución y la domesticación de los cítricos y el significado del alto nivel de polimorfismos encontrado. Estos resultados son básicamente idénticos a los presentados por el Consorcio Internacional y difieren de la presentación oral que realizó el grupo chino sobre el origen de la Naranja dulce que atribuye la presencia de pummelo a uno sólo de los parentales de la naranja.

El siguiente panel (Chung y cols.) reportó sobre la secuenciación genómica y el análisis comparativo de *Citrus platy-mamma* (Byungkyool), una especie de cítricos nativos en Jeju Island (Corea del Sur) en una aproximación similar a las presentaciones orales que reportan la secuenciación de grupos numerosos de genomas.

En el trabajo siguiente, Ohta y cols., reportan que han desarrollado un **método directo de genotipado** para cítricos rápido y rentable basado en la PCR. Este método consta de dos pasos: (1) una punción de una hoja y (2) la inmersión de la aguja en una mezcla de PCR o una

solución tampón directamente para preparar una muestra de ADN.

Finalmente los dos paneles presentados por Silva y cols., y Distefano y cols., presentaron dos estudios sobre la utilidad de la **minería de datos** y la **biología de sistemas** para la identificación de genes clave implicados en la calidad de los cítricos y sobre el uso de la fusión de alta resolución (HRM) para el genotipado de los cítricos. En el primer trabajo, se utilizaron algoritmos específicos para identificar los módulos y nodos centrales dentro de las distintas bibliotecas de cítricos con la idea de utilizar los resultados como guía para seleccionar genes específicos de cítricos para nuevos estudios funcionales como la expresión génica o la transformación de plantas. En la última presentación, por primera vez se aplicó la HRM al análisis de los cítricos para detectar la presencia de SNPs o polimorfismos. Los resultados sugieren que este es un método eficiente, rentable y preciso a la hora de detectar variaciones en la secuencia.

Agradecimientos

El trabajo del autor incluido en este artículo ha sido subvencionado por el Consorcio Citruseq y por el Ministerio de Ciencia e Innovación mediante los proyectos PSE-0600002009-8 e IPT-010000



RIESGOS CLIMÁTICOS EN CÍTRICOS. SINTOMATOLOGÍA Y EVOLUCIÓN DE DAÑOS.

Miguel Ángel Torres Ramírez. 103 págs. 131 fotografías color. (2010).

CONTENIDO: **Introducción.** I – Riesgo de helada. II – Consideraciones al cuantificar las pérdidas ocasionadas por el riesgo de helada. III – Riesgo de granizo. IV – Consideraciones al cuantificar las pérdidas ocasionadas por el riesgo de granizo. V – Riesgo de viento. VI – Consideraciones al cuantificar las pérdidas ocasionadas por el riesgo de viento. VII – Riesgo de viento seco-cálido. VIII – Consideraciones al cuantificar las pérdidas ocasionadas por el riesgo de viento cálido. IX – Riesgo de inundación, lluvia torrencial y lluvia persistente. X – Consideraciones para la cuantificación de los riesgos de inundación, lluvia torrencial y lluvia persistente. XI – Aforo de cítricos. XII – Identificación práctica de especies por sus hojas. XIII – Protocolo de identificación práctica de variedades de cítricos. **Anexo I. Índice de fotografías. Bibliografía**

P.V.P. 25 €- (Envíos contra reembolso. I.V.A. incluido. Gastos de envío aparte)
PARA PEDIDOS: EDICIONES L.A.V., S.L. Tel.: 96/ 372 02 61 pedidos@edicioneslav.com